

### 3. Melanin production suppressing agents

From the mechanisms of the production and metabolism of melanin in skin, it is thought that the mechanisms of action of a skin-whitening pharmaceutical include suppression of the production of melanin in a melanocyte, reduction of the produced melanin, promotion of excretion of melanin which exists in epidermis, and selective toxicity to the melanocyte. Above all, from a perspective of moderation of the action on the melanocyte, a whitening cosmetic is formulated with, as an active ingredient, a drug which mainly exerts the melanin production suppressing action, such as arbutin, kojic acid, vitamin C, and a derivative thereof. Hereinafter, description is made of drugs which are approved to have an effectiveness as a quasi-drug base compound and is commercially available as a drug having an efficacy of "preventing spots and flecks due to suntan" (Fig. 6-4).

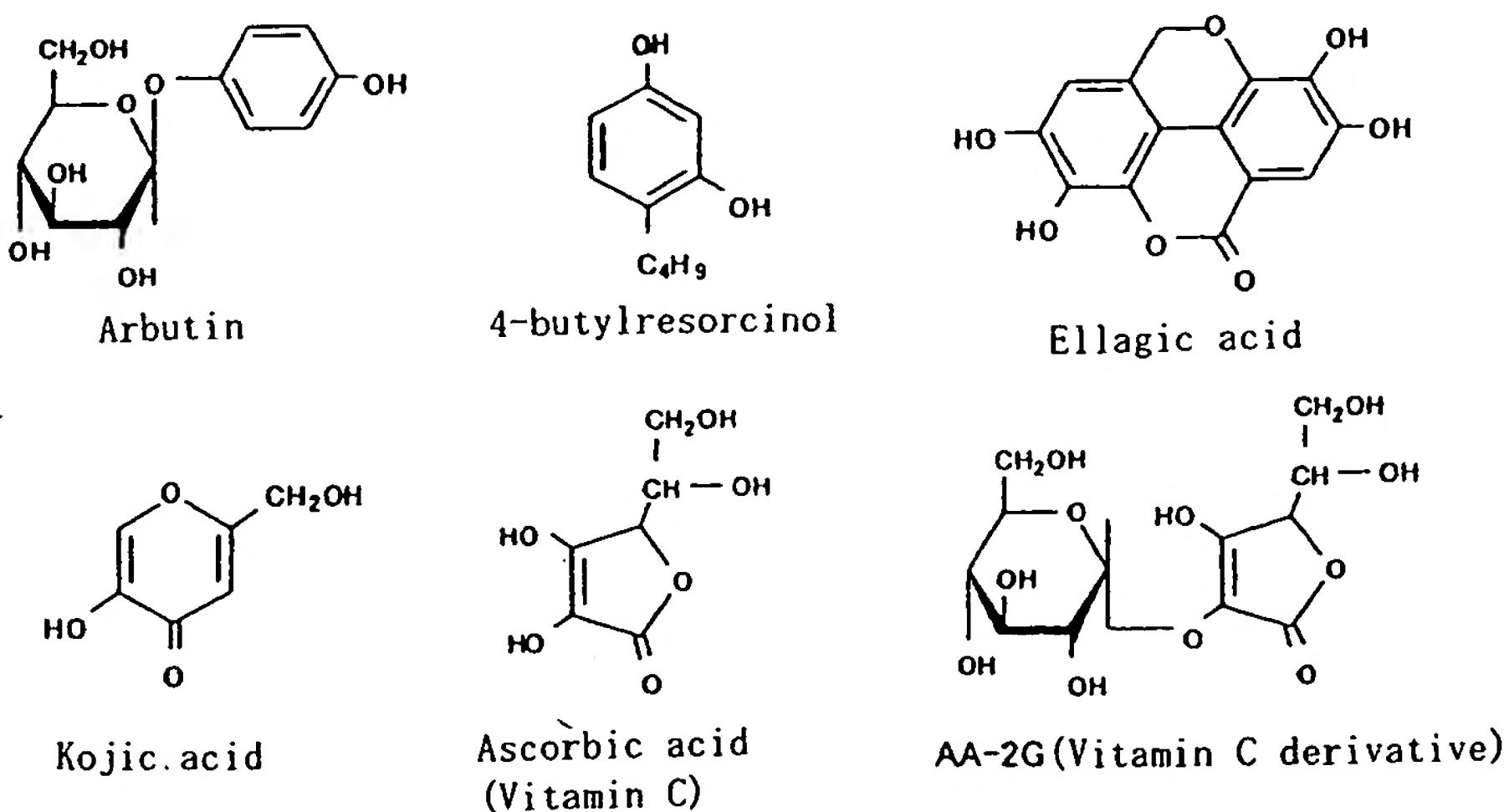


Fig. 6-4 Active ingredients of a whitening cosmetic (a quasi-drug)

(1) Arbutin

Arbutin has a chemical name of hydroquinone- $\beta$ -D-glucopyranoside, and has a glucoside structure in which glucose is bound to hydroquinone. Arbutin is a component included in leaves of alpine plants such as cowberry/lingonberry, or the like. It is reported that the main mechanisms of action of the melanin synthesis suppression include 1) competitive inhibition of tyrosinase activity or an effect of suppressing TRP-1 activity, 2) suppression of formation or elongation of a dendrite of a melanocyte caused by ultraviolet light, and 3) suppression of the generation of a superoxide anion ( $O_2^-$ ) and a hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )<sup>68)</sup>. It is indicated that the melanin production suppressing action of arbutin is not due to a cytotoxic effect against a melanocyte as that of hydroquinone monobenzyl ether, and that arbutin does not exert its effect by being metabolized into hydroquinone<sup>69)</sup>. The suppressing effect of arbutin on pigmentation which is induced by applying ultraviolet light to a human skin is investigated through a double masking method and the clinical effectiveness of arbutin is reported to be effective in human<sup>70)</sup>. Further, the clinical effectiveness of arbutin for spots such as chloasma is also reported<sup>71, 72)</sup>.

(2) Kojic acid

Kojic acid is a  $\gamma$ -pyrone compound having a chemical name of 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone. Kojic acid generates mainly in a fermentation liquid of a filamentous fungus belonging

to the genus *Aspergillus* or the genus *Penicillium*, and is thought as an important factor for color, flavor, or the like of miso (i.e., a fermented soybean paste), soy sauce, or sake (i.e., Japanese rice wine). It is reported that the melanin production suppressing action of this compound includes a noncompetitive inhibition of tyrosinase, which is caused by a chelating action with copper that is a prosthetic group of tyrosinase, and also includes suppression of polymerization of DHI and DHICA, or the like<sup>73)</sup>. It is reported that in a clinical investigation, application of a kojic acid cream is effective for pigmentation induced by application of ultraviolet light and, further, for spots<sup>74, 75)</sup>.

#### (3) Ellagic acid

Ellagic acid is a compound which has a polyphenol structure and presents in a wide variety of plants such as strawberry and apple. Ellagic acid is purified from a Leguminosae plant "tara" (i.e., *Caesalpinia spinosa*), which grows in a desert area in western South America, serving as a start raw material. Its main action mechanisms of suppressing melanin synthesis are reported to include 1) suppression of activity by a tyrosinase-copper ion chelating action, 2) an antioxidant effect, and the like<sup>76)</sup>. Results of clinical investigation on the effects of ellagic acid on the pigmentation induced by application of ultraviolet light is also reported<sup>77)</sup>.

#### (4) Rucinol

Rucinol has a chemical name of 4-n-butylresorcinol, and is

one of resorcin derivatives selected from a series of 4-alkylresorcinol, based on an investigation thereof using a substance included in a fir tree as a lead compound. The inhibition mechanisms thereof are reported to include 1) inhibition of tyrosinase activity and 2) a TRPI (i.e., DHICA oxidase) suppressing action<sup>77)</sup>. It is reported that as a clinical efficacy, application of a rucinol-formulated essence is effective for pigmentation induced by applying ultraviolet light in human<sup>78)</sup> and further, for a patient suffered with chloasma<sup>79)</sup>.

(5) Chamomilla ET

Chamomilla ET is a crude drug extract, which is selected using, as an index, the suppression of calcium mobilizing action by addition of endothelin. Chamomilla ET is reported to have a main action mechanism of melanin synthesis suppression of pathways from bonding of endothelin to an endothelin receptor to production of inositol triphosphate<sup>48)</sup>. Results of clinical investigation on the suppressing effects on the pigmentation induced by application of ultraviolet light is also reported<sup>80, 81)</sup>.

(6) Vitamin C and its derivatives

Vitamin C is also referred to as ascorbic acid. It is the most typical melanin production suppressing agent in medicinal cosmetics and has been used for a long time. Ascorbic acid is reported to have pigmentation suppressing effects including 1) an action of reducing dopaquinone, and 2) an action of reducing melanin, and

the like. Ascorbic acid is highly safe but is extremely weak against heat or oxidation and thus unstable. Therefore, to cover the shortcomings, various derivatives have been developed and used. It is reported that vitamin C phosphate (i.e., a magnesium salt thereof) releases vitamin C when incubated in a skin extract, and that in a tissue specimen of a guinea pig skin, vitamin C is detected in a region where vitamin C phosphate has been consecutively applied while not detected in a region where no vitamin C phosphate has been applied, so the action of vitamin C phosphate is due to vitamin C obtained from metabolism of vitamin C phosphate in a living organism. Clinical effectiveness on spots such as chloasma is also reported<sup>82)</sup>.

Vitamin C-2 glucoside (AA-2G) has found as a novel stable vitamin C derivative in the process of a research related to a vitamin C glucoside using an enzyme of a mammal by Yamamoto et. al., and its chemical structure was identified as 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid<sup>83)</sup>. It is also referred to as a long-acting vitamin C, because it is extremely stable in an aqueous solution and is gradually hydrolyzed in a living organism by means of a function of  $\alpha$ -glucosidase to generate vitamin C, thereby exerting its effectiveness. For that process, effects are expected to continue for a long period of time<sup>84)</sup>. The clinical effectiveness of AA-2G is reported to be effective by investigating, through a double masking method, the suppressing effect of AA-2G on pigmentation induced by applying ultraviolet light to a human skin<sup>85)</sup>.

(7) Placenta extract

A placenta extract is extracted from a bovine, a black sheep, or the like and has been used for cosmetics for a long time. The placenta extract is a component, which contains plenty of vitamins, amino acids, minerals, and the like. It is reported that its pigmentation suppressing effects include 1) suppression of a dopa reaction from tyrosine (e.g., inhibition of tyrosinase activity)<sup>86)</sup>, metabolism activation (e.g., promotion of melanin excretion) by a kelatolytic action or a cell activating action, and the like<sup>87)</sup>.

Recently, there has been given a directive, which prohibits the use of the placenta extract from the perspective of bovine spongiform encephalopathy.

# 化粧品の有用性 評価技術の進歩と将来展望

監修

武田克之

日本香粧品科学会理事長  
徳島大学名誉教授・前学長

原田昭太郎

日本皮膚科学会理事長  
NTT東日本関東病院副院長

安藤正典

国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部部長

BEST AVAILABLE COPY

編集企画

日本化粧品技術者会

薬事日報社

の遊走  
白皮症  
子異常  
,  
, 肝細  
たもの  
トの増

e col-  
中球や  
する因  
ランゲ  
田られ  
ノサイ  
ヒト  
ことが  
なく、  
うの誘

毛頭細  
くラノ  
うるこ  
ノサ  
R) の  
質で  
接作

、  
ケー  
phos-  
報告  
(2),  
アラ  
炎症  
中に  
接作  
14,65).  
によ  
ノサ  
成誘  
erと

すること等が報告されている<sup>66,67)</sup>。

### 3. メラニン生成抑制剤

皮膚におけるメラニン生成および代謝機構から、美白薬剤の作用機序として、メラノサイト内でのメラニン生成抑制、既成メラニンの還元、表皮内メラニンの排出促進、メラノサイトに対する選択的毒性が考えられる。その中で、美白化粧品にはメラノサイトに対する作用の緩和性から、アルブチン、コウジ酸、ビタミンCおよびその誘導体等メラニン生成抑制作用を主とした薬剤が有効成分として配合されている。以下、医薬部外品主剤として有効性が承認され、「日焼けによるしみ・そばかすを防ぐ」効能で市販されている薬剤について述べる(図6-4)。

#### (1) アルブチン (Arbutin)

アルブチンは、化学名をhydroquinone- $\beta$ -D-glucopyranoside (4-ヒドロキシフェニル- $\beta$ -Dグルコピラノシド)といい、ハイドロキノンにグルコースが結合した配糖体構造をとっている。高山植物のコケモモの葉などに含まれる成分である。メラニン合成抑制の主要な作用機序として、1) チロシナーゼ活性の拮抗阻害、TRP-1活性の抑制効果、2) 紫外線によるメラノサイトの樹枝状突起の形成や

伸長の抑制、3) スーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)およびヒドロキシラジカル(-OH)產生抑制などが報告されている<sup>68)</sup>。アルブチンのメラニン生成抑制作用はハイドロキノンモノベンジルエーテルのようなメラノサイトに対する細胞毒性作用によるものではないこと、またハイドロキノンに代謝されて効果を現すものでもないことが示されている<sup>69)</sup>。アルブチンの臨床効果については、ヒト皮膚に紫外線を照射し、誘導される色素沈着に対する抑制効果を二重遮蔽法により調べ、そのヒトでの有効性が報告されている<sup>70)</sup>。さらに肝斑等のしみに対する臨床効果についても報告されている<sup>71,72)</sup>。

#### (2) コウジ酸 (Kojic acid)

コウジ酸は化学名5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyroneである $\gamma$ -pyrone化合物であり、主として *aspergillus* 属や *penicillium* 属などの糸状菌の醸酵液中に产生され、味噌、醤油、酒などの色や風味などの重要な因子であるといわれている。この化合物のメラニン生成抑制作用に関しては、チロシナーゼに対する非競合阻害であり、チロシナーゼの補欠分子である銅とのキレート作用によるここと、また、DHI 及び DHICA の重合抑制等が報告されている<sup>73)</sup>。臨床試験として、紫外線

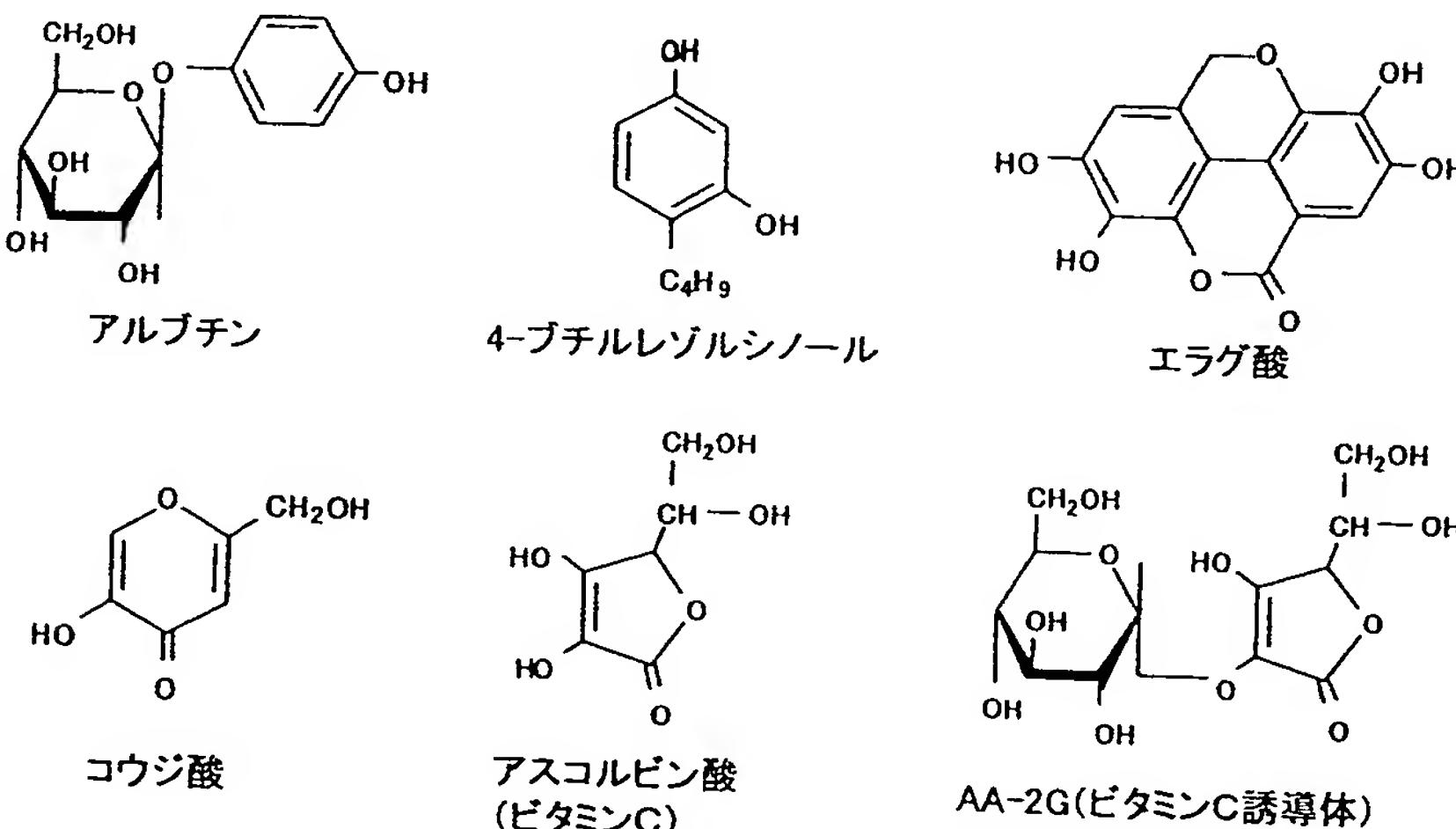


図6-4 美白化粧品(医薬部外品)の有効成分

照射誘導色素沈着、さらにしみに対して、コウジ酸クリーム塗布が有効であることが報告されている<sup>74,75)</sup>。

### (3) エラグ酸 (Ellagic acid)

エラグ酸は、イチゴやリンゴなどの植物に広く存在するポリフェノール構造を有している化合物である。南アメリカ西部の砂漠地方に生育しているマメ科植物タラを出発原料として精製する。メラニン合成抑制の主な作用機序として、1) チロシナーゼ銅イオンキレート作用による活性抑制、2) 抗酸化効果等が報告されている<sup>76)</sup>。紫外線照射誘導色素沈着に対する、エラグ酸の効果についての臨床評価結果も報告されている<sup>77)</sup>。

### (4) ルシノール (Rucinol)

ルシノールは、化学名4-n-butylresorcinolといい、モミの木に含まれる物質をリード化合物として、一連の4-アルキルレゾルシノールについて検討した結果選択されたレゾルシン誘導体である。その阻害機序としては、1) チロシナーゼ活性阻害、2) TRPI (DHICAoxidase) 抑制作作用が報告されており<sup>77)</sup>、臨床効果としてヒト紫外線照射誘導色素沈着に<sup>78)</sup>、さらに肝斑患者に対して、ルシノール配合美容液塗布が有効であることが報告されている<sup>79)</sup>。

### (5) カモミラ ET

エンドセリン添加によるカルシウム動員作用の抑制を指標に、選択された生薬エキスであり、メラニン合成抑制の主な作用機序として、エンドセリン受容体への結合とイノシトールトリフオスフェートの生成までの経路間を阻害することが報告されている<sup>48)</sup>。紫外線誘導色素沈着に対する抑制効果の臨床結果が、報告されている<sup>80,81)</sup>。

### (6) ビタミンC誘導体 (Vitamin C and its derivatives)

ビタミンCはアスコルビン酸ともいい、薬用化粧品において最も代表的なメラニン生成抑制剤であり、古くから使用してきた。ア

スコルビン酸の色素沈着抑制効果は、1) ドーパキノンの還元効果、2) メラニンの還元等が報告されている。アスコルビン酸は、安全性は高いが、熱や酸化に極めて弱く不安定なため、その欠点を補うために種々の誘導体が開発され用いられている。ビタミンCリシン酸エステル（マグネシウム塩）は、皮膚抽出液中でインキュベートするとビタミンCに遊離すること、また、モルモット皮膚への連続塗布後の組織標本で無塗布部位には検出されないビタミンCが検出されることから、その作用は生体中で代謝されて生じたビタミンCによることが報告されている。肝斑等のしみに対する臨床効果についても報告されている<sup>82)</sup>。

ビタミンC-2グルコシド (AA-2G) は、山本らにより哺乳動物の酵素によるビタミンC配糖体に関する研究過程で、新規安定型ビタミンC誘導体として発見され、その化学構造が2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシリル-L-アスコルビン酸であることが同定された<sup>83)</sup>。水溶液中で非常に安定であり、生体内では、 $\alpha$ -グルコシダーゼの働きで徐々に加水分解されてビタミンCを生じ、その効力を発揮することから、長時間の効果の持続が期待され持続型ビタミンCともいわれている<sup>84)</sup>。AA-2Gの臨床効果については、ヒト皮膚に紫外線を照射し、誘導される色素沈着に対する抑制効果を二重遮蔽法により調べ有効であることが報告されている<sup>85)</sup>。

### (7) プラセンタエキス

胎盤エキス（牛、黒羊などから抽出）ともいわれ、古くから化粧品に使われてきた。ビタミン、アミノ酸、ミネラルなどを豊富に含んだ成分である。色素沈着抑制効果は、1) チロシンからのドーパ反応の抑制（チロシナーゼ活性阻害）<sup>86)</sup>、2) 角質溶解作用、細胞の賦活作用による代謝活性化（メラニンの排出促進）等が報告されている<sup>87)</sup>。

最近、狂牛病の観点から使用禁止の指示が

, 1)  
の還  
は、  
不安  
誘導  
Cリ  
膚抽  
ンC  
への  
検出  
から、  
タミ  
等の  
れて

・山  
ンC  
ビタ  
毒造  
フル  
夜中  
レコ  
ギタ  
・か  
リビ  
)臨  
照射  
を告

もビ  
含 )  
シ胞  
排  
が

だされた。

#### 4. メラニン生成抑制剤の評価法

##### 4-1. 評価技術概論

メラニン生成抑制剤の評価と一口にいっても、新たに薬剤をスクリーニングするための評価方法と、特定された薬剤の作用機序を解明するための評価とでは、その試験方法自体の選択、組み立て方が異なる。スクリーニングには、多量のサンプルを同時期にこなさなければならぬ簡便さ等が重要視されるであろうし、作用機序解明には、真理を求めていくための多方面からの解析技術が必要である。いずれにしても薬剤の効果評価として最終的に行き着くところは、ヒトでの効果試験(臨床試験)であることに変わりはない。メラニン生成抑制剤の評価方法の例を表6-1に示す。

表6-1の中でも、特定された薬剤に対する細かな作用機序解明のための評価方法は個々の文献に譲ることとし、ここではスクリーニングを意識した一般的なメラニン生成抑制剤の評価から、ヒト試験系までを一連の流れとして概説する。

##### 4-2. *in vitro* 評価技術

###### (1) *In vitro* による一次スクリーニング方法

まず、メラニン生成抑制剤のスクリーニングを行うには、日焼けによるしみ・そばかすの生成機構を知らなくてはならない。ところがしみ・そばかすの生成機序は、未だに不明の点が多く解明されてはいない。そこで、日焼けによる色素沈着を防ぐこと、つまり過剰な色素生成を抑えることがその後のしみ・そばかすを防ぐことになるとの考えから、日焼けとその後の黒化過程を抑えるということを主に薬剤スクリーニングが行われている。しかしながら、日焼け等による過剰な色素生成に関しても単純なスキムで説明できないこと

は、色素沈着のメカニズムとして前述した通りである。そのような中、現在まで承認されている美白有効成分のほとんどがチロシナーゼ活性阻害を作用点としているが、それは、メラニン合成のキー酵素であるチロシナーゼ活性さえ抑えれば、とにかく過剰な色素生成が抑えられるという対処療法的な考え方で選択されている方法である。現在でも今なお主流の考え方であり、確かな方法ではある。さらに、とにかく作用機序は当面わからなくとも細胞レベルでメラニン合成功量の低下を指標にスクリーニングすれば、メラニン抑制剤を選択できるという方法も並行して行われている。この方法では、上記チロシナーゼ阻害剤も同時にスクリーニングされるが、それ以外のものでも作用機序はあとから解明すればよいという考え方である。一方、表皮細胞からの情報伝達物質に対する阻害剤等を選択するには、一次スクリーニング段階で特定の情報伝達物質をターゲッティングしている方が好ましい。その場合は目的に沿った特殊な系を構築する必要があるのはいうまでもないことである。

###### (2) チロシナーゼ活性阻害試験

チロシナーゼ酵素材としてマッシュルーム由来のチロシナーゼ(Sigma 社)、マウスB16メラノーマおよびヒト皮膚由来メラノサイトが汎用されている。チロシナーゼに対する阻害様式は酵素材の違いにより、さらにアイソザイムの違いにより著しく異なる場合があるので、その点を十二分に認識したうえで試験を行わなくてはならない。酵素活性の測定は、チロシンハイドロキシラーゼとドーパオキシダーゼとで異なる。前者は、トリチウム標識したチロシンを基質としてドーパに変換される際に遊離してくるトリチウム標識の水の量をシンチレーションカウンターで計測する方法であり、後者は、基質であるドーパから変換したドーパクロムを吸収波長

BEST AVAILABLE COPY

## 化粧品の有用性—評価技術の進歩と将来展望—

2001年3月31日 第1刷発行

不許  
複製

医学博士 武田 克之  
監修 医学博士 原田 昭太郎  
薬学博士 安藤 正典

編集企画 日本化粧品技術者会

〒224-0025 神奈川県横浜市都筑区早瀬町2-2-1  
資生堂リサーチセンター(新横浜)内

TEL 045-590-6025  
FAX 045-590-6093

発行 株式会社 薬事日報社

〒101-8648 東京都千代田区神田和泉町1番地

TEL 03-3862-2141  
FAX 03-3866-8408

カバーデザイン：宮辺和司

印刷所：昭和情報プロセス(株) ホームページ <http://www.yakuji.co.jp/>

ISBN4-8408-0650-0

**THIS PAGE LEFT BLANK**